# 前川文夫*・竹内正幸*・加藤博之*：器内培養における“胚発生”**

# Fumio Maekawa,* Masayuki Takeuchi* & Hiroyuki Kato*: “Embryogenesis” *in vitro***

(Pl. VIII & IX)

生体内における胚発生の形態学的な研究は 19 世紀の中頃から 20 世紀の現在に至るまで，非常に多くの学者によって報告されている。これらの中には apomixis，すなわち受精卵以外の細胞からの胚発生の報告もみられる。例えば未受精の卵細胞，助細胞，反足細胞等の単相 (n) の細胞や珠心の細胞などの複相 (2n) の細胞からの不定胚 (adventive embryo)，また胚珠以外の 2n 細胞からの不定胚としてセイロンベンケイソウの foliar embryo (Berge 1877, Yarbrough 1932, Naylor 1932) 等がそれである。

一方組織培養の方法が確立して，培養組織からの shoot の形成，あるいは shoot-root axis の形成がセコイア，カブラタマナ，ニンジン，タバコ等でみられている。また培地の組成を変えることによって，これらの組織からの器官形成を調節することも知られている。例えば Skoog (1950, 1954) はタバコの培養株について，Pilet (1961) はニンジンの特定の株について，インドール酢酸 (IAA) とカイネチン (kinetin) の濃度の組み合せによって shoot と root の発生を制御している。Levine (1950), Reinert (1959), Pilet (1961) は IAA の濃度を低くするか，IAA を培地からとりのぞくことによって shoot の分化を見ている。

また Hildebrandt et al. (1958, 1960), Steward (1958), Braun (1959) はある一定条件下で游離単細胞が in vitro で多細胞体にまで生長できることを示した。さらに Steward と Reinert, Pilet は夫々独立に単細胞起源の組織から，または組織内の単細胞から幼植物への分化をみている。

我々は分化した組織から単細胞を分離培養して，これから 2n の不定胚と相同な幼植物の発生を観察した。

## 材料及び方法

この実験を通じてニンジン (*Daucus carota*) の直根 (tap-root) を材料とした。直根は実験室でよく水洗いして，ウスプルン 1.0 g/l の液に入れ無菌室に置く。15 分後に滅菌蒸溜水で洗う。径 6 mm のコルク・ボーラー (cork-borer) で形成層を含んだ組織をたてに打ち抜き棒状とする。この棒状組織を滅菌したカミソリの刃で1 mm の厚さ

---

* Department of Botany, Faculty of Science, University of Tokyo. 東京大学理学部植物学教室.

** この研究は文部省科学研究費（総合研究費）の助成を受けて行われた.

に切り，円板状の切片として培地に植える。培地は Tab. 1 のような White 氏の基本培地に 0.1% の Difco yeast extract, 1 ppm の β-IAA, 0.5% の寒天を附加して，加圧滅菌（+1 気圧, 15 分間）したものを使用する。寒天培地は 20×150 mm の試験管に 12 cc ずつ入れるか，50 cc のエルレンマイヤのフラスコに 25 cc ずつ入れて綿栓をする。廻転培養のためには寒天を除いた液体培地とし，16×150 mm の試験管に分注し，二重ゴム栓をする。廻転はモーターでドラムを廻しそのドラムに試験管 200 本を挿入する。廻転速度は 1 rpm とする。温度は 27°±1°C で，暗所と室内散乱光とで培養した。最初に植えた組織片（explant）からは新しい細胞群ができてくる。これを 20 日毎にはじめの培地と同じ組成の培地にイリスナイフとピンセットで分離して移植する。明所培養では細胞の増殖がおそいので explant をも同時に移殖する。数代の培養後，培養株は非常にもろい細胞の集りとなる。このような株の組織は液体培地で廻転培養し，游離単細胞の集団とすることが出来る。また一方では寒天上に生じた液中にはもろい組織から細胞，あるいは細胞の小集塊が游離して浮游しているから，これらの単細胞をミクロピペットでとり出して，平型試験管に入れ観察を続ける。

Tab. 1.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| A=(a+b) | | | B | | |
| $Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$ | 7.2g | a | Glycine | 300mg | |
| $Na_2SO_4 . 10H_2O$ | 11.45 | | Nicotinic acid | 50 | |
| KCl | 2.0 | | Thiamine | 10 | |
| $NaH_2PO_4 . H_2O$ | 1.65 | | Pyridoxine | 10 | |
| $MnSO_4 . 4H_2O$ | 0.2 | | Water | 100 cc | |
| $ZnSO_4$ | 0.04 | | C=(c+25cc of d) | | |
| $H_3BO_3$ | 0.04 | | Sucrose | 20g | c |
| KI | 0.02 | | Water | 500 cc | |
| Water | 2000cc | | $Fe_2(SO_4)_3$ | 10mg | d |
| $MgSO_4$ | 9.0g | b | Water | 100 cc | |
| Water | 500cc | | | | |

(A)100cc+(B)10cc+(C)+water 365cc=1000cc of solution. pH: 5.5

### 観察結果

移植された組織片は直ちに分裂をはじめて，寒天培地の反対側に橙黄色の固い組織（カルス callus）が盛り上って来る。室内散乱光下では分裂が遅く新しい組織は僅かしかできないが，暗所ではこの callus 形成がさかんである。

約 40 日後，すなわち 2 回の移植を終った橙黄色の callus の上や，植え継がれた explant の縁辺部に淡黄色，もしくは無色に近い游離し易い callus (colorless friable callus, 以下 cl. f-callus. と記す) ができる (Pl. VIII-1)。これらの cl. f-callus の中に

は小組織塊が分離して来て，その小塊からは根が出てくるものがみられる (Pl. VIII-2)。この小塊の外部的な形態はもちろん，ミクロトーム切片でみられる分裂細胞群による同心円状構造からみても Steward et al. (1958) の nodule または growth center と同じ意味のものと考えられる (以下この小塊を nodule と名づけておく)。

3 回目の移植直後から nodule 上に芽，すなわち苗条 (shoot) が見出され (Pl. VIII-3, 4)，この際に nodule があらかじめ根を形成していても，また全く形成していなくても芽の形成はみられる。すなわち根と芽は各々独立に分化形成されるのである。しかしながら形成された後にこの芽と根とは callus の組織内を通じて連絡を持ち，やがて callus 中に shoot と root を結ぶ維管束の分化をみる。こうして shoot-callus-root axis が完成して幼植物となる (Pl. VIII-3, 4)。Shoot の先端には最初 2 個の葉が分化してくるが，この葉は対生し，多くのものが分裂せず，全体からみて子葉と同じとみられる (Pl. VIII-5)。この 2 枚の葉の間から長い葉柄と分裂した葉身をもった第一葉が伸びてくる (Pl. VIII-5)。これら shoot の形成は時間的に大きな巾があって，よりおそく分裂増殖して出来た callus では shoot の形成もおくれる。また IAA の濃度を高めたり，培地に adenine を加えたりしたときにも shoot の形成はおくれた。

約 4 ケ月後，6 回移植の後に cl. f-callus から，単細胞，あるいは 2〜3 個の細胞から成る細胞塊がほどけて落ちる。この単細胞のあるものは器壁と寒天培地の間に落ち込み，外部からの観察が容易となった。またあるものは寒天上の液体中に浮游している。そしてこの単細胞は恰も受精卵から幼植物への胚発生の過程と同じような過程を経て新しい個体となる。例えば 2 細胞期，4 細胞期 (Pl. IX-1)，胚柄状の細胞の分化 (Pl. IX-2)，多細胞からなる球体期 (globular stage)，軸の一端における子葉の発生 (Pl. IX-5)，軸の他端の組織内に幼根の分化 (このとき全体は倒心臓形)，胚軸の伸長 (Pl. IX-6, 7)，子葉の展開 (Pl. IX-8)，幼植物等の各段階がみられる。これと同様の経過は cl. f-callus を廻転培養にしたときにも観察された。

培養期間中に光をあてると，発生過程にある幼植物はもちろんのこと，未分化の callus まで緑色となる。緑色になった幼植物は移植すれば戸外で正常な発育を遂げて新しい正常なニンジンの個体となることができる。

## 論 議 及 び 検 討

Hildebrandt et al. (1958, 1960) は組織培養株の上に沪紙を置き，その上に游離単細胞を置いて育て，単細胞起源の組織塊を得た。このような単細胞を育てる組織培養株を nurse cultures と呼んだ。また一度組織の培養に用いられた培地を基本培地に入れることで単細胞の連続的分裂が可能であることを見出して，このような培地を conditioned medium とよんだ。このことは単細胞の分裂への転機として既存の組織塊又はそれから出た何等かの物質が誘導的な役割をはたす可能性を示している。

我々の観察した寒天培地上の単細胞からの分裂過程は cl. f-callus を培養しつつある

培地上で進行したものであって，寒天培地上で我々の得た発生過程は彼等のいう conditioned medium の上で起ったとみることができる。また全く新しい培地に単細胞ひとつを入れて培養したときは分裂過程をみることができなかったが，単細胞群を新しい培地に入れたときには巨大細胞化するものもあれば細胞分裂を行うものも観察された。

Steward et al. (1958) はココナットミルクを培地に加えて，その刺戟によってニンジンの単細胞が分裂して nodule にまでなることを報告した。そして生長分化の盛んな nodule を特に多細胞生長単位 (multicellular growing unit) とよんでいる。この nodule の段階になって，根の分化を見，次いで shoot の発生を見て，その結果 shoot-root axis が完成し，幼植物になった。また游離細胞から多細胞生長単位までの過程はちょうど受精卵から proembryo への発達初期の過程に似ていると述べている。さらに単細胞から多細胞生長単位までの一連の細胞分裂，組織分化は胚嚢内の栄養に富んだ液と同じ価値をもつココナットミルクの中で行われたことを強調している。しかし Reinert (1958) は基本培地にココナットミルクと IAA を加えた培地から合成培地に IAA のみを加えた培地に移植し，さらに約3ヶ月後に合成培地だけにすると，組織内部の，しかも表面に近く位置するある単細胞が卵発生の過程と似た過程をたどって幼植物になることを報告した。またこれは恰も胚嚢内の珠心起源の不定胚 (adventive embryo) のようであるとも述べている。このことは IAA を取り去る効果を示したもので Pilet (1961) も同様にニンジンの組織培養において培地から IAA をとり去って shoot の形成を見ている。そして Steward の観察した游離巨大細胞が分裂組織的な分裂をする結果多細胞体になるのと同じような過程を見ている。さらに細胞数がふえ組織塊となったときその中の 1 個の細胞が Reinert の adventive embryo に相当する pseudoembryo となることを報告している。

我々は yeast extract を含んだ培地で游離単細胞が全く正常な胚発生と同じような発生過程を経て幼植物となることを見た。また他方，培養した callus 上に根と芽が独立につくられ，それらが後に連絡することも観察した。以上のことから考えると分化成熟した植物体の体細胞でも環境条件が好適なとき，callus から直接に，または callus から一旦游離単細胞という時期を経て，再び完全な植物体にもどり得る能力をもっていることがわかる。いいかえるならば各細胞は全形成能 (totipotency) をもっていることであると同時に，分化という現象は細胞の主要構造中の遺伝的な形態の荷い手を変えることによってではなく，何等かの抑制が加わることで主として成立することがみとめられる。しかし Pilet (1961) の実験によって，ある組織培養株では全然器官をつくらない株もあるし，またよく IAA の濃度，カイネチンと IAA の組合せによって器官形成を調整することのできる株もあることが示された。そして彼は Gautheret (1959, p. 329) の「組織培養株における新しい器官の形成は基本的には spontané である」という結論に対して，僅かではあるが異った事実をみとめたと述べている。我々の培養して

いる多くの株の中には Pilet の示したように，他の株が器官形成を起す条件を与えても，器官をつくらないで未分化の callus の状態で生育を続けるものもある。したがって現在の研究段階においては Gautheret の結論を全面的にしりぞけることは出来ない。今までの主な結果を綜合的に図示すると図 1 のようになる。

さらに単細胞からの発生過程が我々の游離細胞の場合にしろ，Reinert や Pilet の組織内の細胞であったにしても，それらが恰も卵発生と同様の過程を必然的にとるという事実の因果関係はまだ不明である。

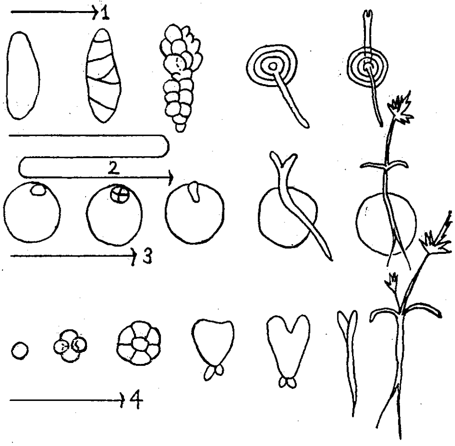


図 1. 器内培養における “胚” 形成の諸形式。1. 巨大細胞→nodule→幼植物 (Steward et al.). 2. 巨大細胞→組織塊→組織内単細胞の分化→pseudoembryo (Pilet). 3. 組織内単細胞→胚発生的分化→adventive embryo (Reinert). 4. 游離単細胞→胚発生的分化→“embryo” (Maekawa, et al).

Fig 1. Schematic figure of the “embryogenesis” *in vitro*. The first arrow (1) shows the developmental course from a giant cell to a plantlet through a nodule or multicellular unit (Steward et al.). The second one (2) shows the course from a giant cell to a pseudoembryo through a nodule (Pilet). The third one (3) shows the course from a single cell in the tissue to an adventive embryo (Reinert). The fourth one (4) shows the course from a single free cell to plantlet through the “embryogenic” course (Maekawa et al.).

しかし巨大細胞の成立の前に多核 (multinucleate) の時期のあること (Steward), 組織塊の中に少くとも 2 個以上の “胚” への発生源を持つこと (Pilet) の事実は系統学的にみて甚だ示唆に富むものである。何故ならば Yakovlev & Yoffe (1957) 及び Cave et al. (1961) が明らかにした被子植物 (*Paeonia* ボタン属が使用された) における受精後の多核の前胚の存在，細胞化後における胚への発生源の複数であることと比較して，まことに似かよったものを見出しうるからである。ボタン属のみから成るボタン科 (Paeoniaceae) は多くの原始的な形質を持つ多心皮類の一科であって，近年特に注目されている (Hutchinson, Eames 等) が，私は特に今まで注意されなかった先行倍数性の立場からもこれを支持したい (前川 1961)。

もしもこの比較が妥当であるならば，組織培養は正常の生活環中ではすでに進化的に失われたと思われる古い生活環の一部や喪失したはずの形態や性質を復活させうる可能性を与えるものとして注目に値する。何となれば多核の前胚期や胚発生源の複数性という現象は，ニンジンの正常の胚発生過程ではすでに見られなくなっているからである。

## Résumé

The authors observed with carrot tissue culture that a single free cell develops

into the "embryo" through a similar course to that of normal embryogenesis from zygote to plantlet, and should like to consider that two ways exist principally in the course of the embryo formation *in vitro*; the one is the course from a giant cell to a plantlet through a nodule or multicellular unit and another is the course from one cell in the tissue or in the free state to an embryo through reminiscent of normal embryogenesis, as the schmatic figure 1.

It is significant for plant phylogeny that there are remarkable similarities between these two ways and the embryogenesis in *Paeonia*, in which multinuclear proembryo and pleural primordia of embryos were reported (Yakovlev and Yoffe 1957, Cave et al. 1961). Carrot has already lost these two respects from its life cycle. If this comparison is verified, the plant tissue culture from a single cell can be expected as strong tool to detect many missing rings in plant phylogeny.

## Explanations to the plates VIII–IX

Pl. VIII. Formation of plantlets from the nodules (cultivated in the dark).

1. Formation of colorless friable calluses (indicated by white arrows) from yellow calluses. 2. Root initiated by the differentiation of the nodule. 3. Formation of shoots from the calluses. 4. Shoot-callus-root axis. At the lower end of the axis, roots are initiated, and at the upper end cotyledon-like leaves are formed. 5. Formation of the primary leaf. Two opposite leaves (at the center) are cotyledon-like leaves and the pinnate leaf with the long petiole between them is the primary leaf.

Pl. VIII. Nodule から小植物体の出来る過程（暗所培養）。

1. 黄色 callus から無色 callus (cl. f-callus 矢印で示す) の形成。2. cl. f-callus からの根の形成。3. Callus からの多数の苗条 (shoot) の形成。4. 完成した shoot-callus-root axis。軸の下端に根を，頂端には子葉類似の葉をつけている。5. 第一葉の発生（中央附近に対生するものは子葉類似の葉。その間から長い葉柄をもった，羽裂した第一葉が伸びている）。

Pl. IX. Developmental process from a single free cell to adult carrot (cultivated in the dark, except 9).

1. Four-celled stage. 2. Two giant, suspensor-like cells (lower left). 3 & 4. Globular stage. 5. Appearance of the two "cotyledons". Two protuberances at the upper left are primordia of the "cotyledons." 6. Elongation of the "hypocotyl". 7. More advanced stage than 6. 8. Unfolded "cotyledons". 9. An adult corrot growing in the field, that originated from a single free cell.

Pl. IX. 游離単細胞から成体への胚発生類似の発達過程。 1. 4 細胞段階。 2. 胚柄類似の 2 個の巨大細胞（左下）。 3, 4. 球状体の段階。 5. “子葉”の発生（左上の 2 突起）。 6. “幼根”が出来“胚軸”の伸びる時期。 7. 培地から立ち上った“胚軸”と“子葉”。 8. “子葉”の展開。 9. 畑に移植した器内培養由来の個体。

## 引用文献

Ball, E. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. Growth **14**: 295–325 (1950). Braun, A.C. A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proc. Nat. Acad. Sci. **45**: 932–938 (1959). Cave, M. S., H. J. Arnott & S. A. Cook. Embryogeny in the California peonies with reference to their taxonomic position. Amer. Journ. Bot. **48**: 397–404 (1961). Gautheret, R. J. La culture des tissus végétaux: techniques et réalisations. Masson Ed., Paris (1961). Hildebrandt, A. C., W. H. Muir & A. J. Riker. The preparation, isolation, and growth in culture of single cells from higher plants. Amer. Jour. Bot. **45**: 589–597 (1958). ———, L. E. Jones, A. J. Riker & J. H. Wu. Growth of somatic tobacco cells in microculture. Amer. Jour. Bot. **47**: 468–475 (1960). Levine, M. The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. I. The culture of the carrot tap-root meristem. Amer. Jour. Bot. **37**: 445–457 (1950). ——— The effect of growth substances and chemical carcinogens on fibrous roots of carrot tissue grown in vitro. Amer. Jour. Bot. **38**: 132–138 (1951). Maekawa, F. Evolutional significance of chromosome number in polycarpicae. Journ. Jap. Bot. **36**: 385–388 (1961). Pilet. P. E. Culture in vitro de tissus de carotte et organogèse. Berichte Schweiz. Bot. Gesel. **71**: 189–208 (1961). Reinert, J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. Naturwiss. **45**: 244–245 (1958). ——— Uber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta **53**: 318–333 (1959). Skoog, F. Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. Ann. Biol. **26**: 545–562 (1950). ——— Chemical regulation of growth in plants. Dynamics of growth processes, Princeton University Press. (1954). Steward, F. C. Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cells to carrot plant. Amer. Jour. Bot. **45**: 709–713 (1958). ——— Growth induction in explanted cells and tissues: Metablic and morphogenetic manifestations in Rudnick, D. (ed.) Synthesis of molecular and cellular structure. Ronald Press. Co., New York (1961). Steward, F.C., M. O. Mapes & J. Smith. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cellls. Amer. Jour. Bot. **45**: 693–703 (1958). ———, ——— & K. Mears. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. Jour. Bot. **45**: 705–708 (1958).

---

## ○DNA 中の G+C の含有量と系統について（前川文夫）Fumio MAEKAWA: Coment on G+C contents

核酸 DNA 中の四つの主要構成単位アデニン (A), グアニン (G), チミン (T), シトシン (C) がワトソン－クリックの模型で知られるような組合せをしていて, A+G と T+C とが丁度等量で相補的に存在することが知られている。そして G+C が A+T の量に対して種々の割合で存在するのはバクテリアでことに著るしい（表紙カット参照。数字は DNA 中にある G+C の量を%で示す。黒い角印は調査された種類を示す。細菌類では 25%—75% の間にちらばっている）。ところが最右端に示す脊椎動物ではほとんど 42% に集中しているのが目立つ。これは種類を超えても同じであり, 一種内の臓器の違いにも関係がないということは核内容の根強い系統的類似性を示すと受けとってよいだろう。そしてこの脊椎動物の数値はその左隣りにある無脊椎動物の範囲内に落ちるからその間のつながりも亦矛盾しない。

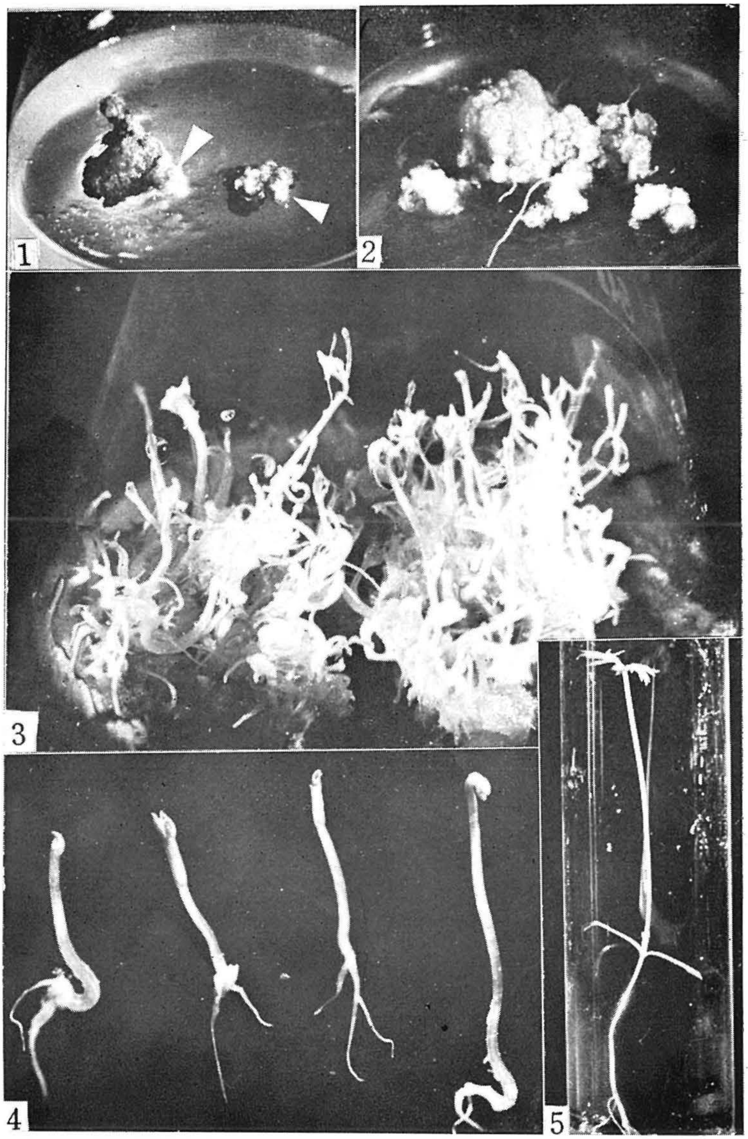
ところが高等植物の範囲は第4列の藻類とくらべて一見上記の動物の場合と似ているが, 注目すべきことは藻類中の上方にある3点はすべて硅藻であって, 高等植物へつづくとみられる緑藻類は下方の 55–65 位の間の諸点で代表されていることである。これは明らかに高等植物とひどくずれている。何分まだこのデータは数があまりにも少ないから, 結論をいそぐことはできないが, 動物における進化と, 植物における進化とはタイプを異にしており, その結果の系統も大きな差があることを暗示するものの如くに思われる。終りに図表の転載を快諾された東大応微研の三浦謹一郎氏に感謝する。

Figure and summary can be found in the cut on the cover and the explanation to it in the back.

（東大・理・植物学教室）

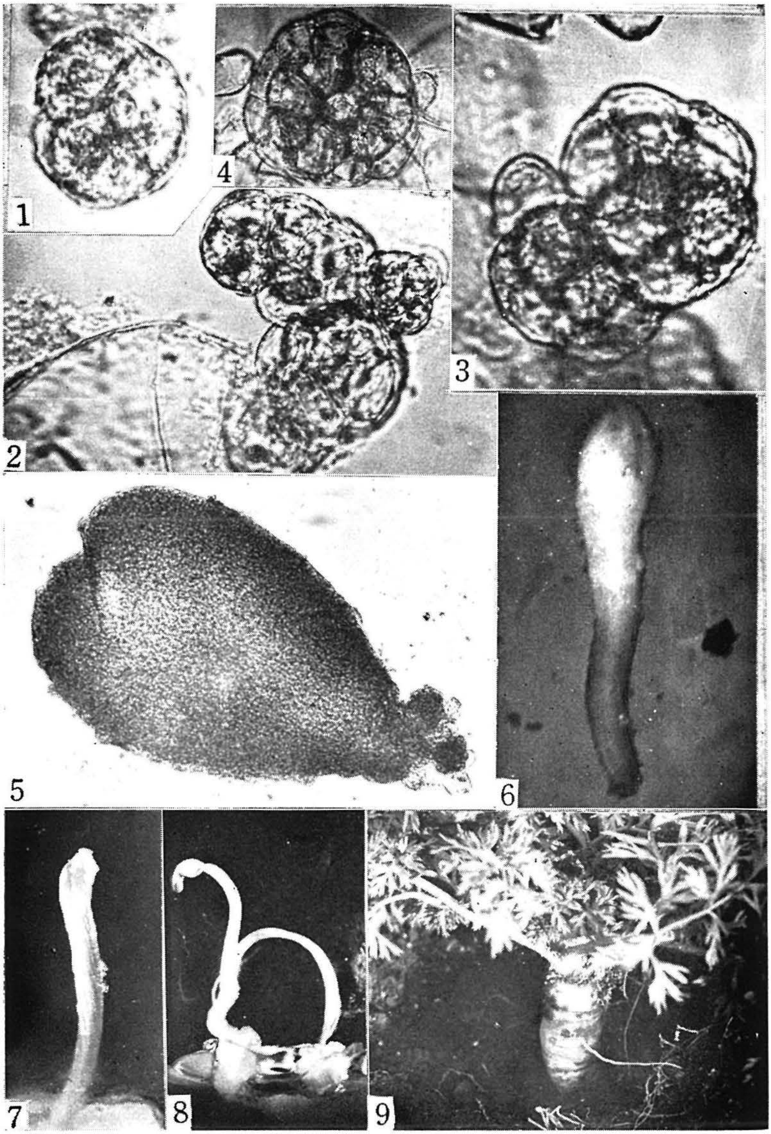
---

□ Tanaka, R. and H. Kamemoto: **Tabulation of chromosome numbers of orchids** pp. 45. The Japan Orchid Society, Kobe (1963, Jan.) 田中隆荘・亀本春行：ラン科植物の染色体数表. 日本蘭協会発行. 近年洋蘭栽培の方で倍数性を利用することが行われはじめた。それを反映して編まれたもの。野生のものも記録してあるので便利である（非売品）。（前川文夫）



Formation of plantlets from the nodules. Further notes are at the end of the text.

F. Maekawa, M. Takeuchi & H. Kato:
"Embryogenesis" *in vitro*



Developmental process from a single free cell to adult carrot. Further explanations are at the end of the text.

F. Maekawa, M. Takeuchi & H. Kato:
"Embryogenesis" *in vitro*